

文章编号:2095-7386(2016)02-0001-11

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2016.02.001

食品致癌物杂环胺的生物标记物的研究状况

彭利娟

(武汉轻工大学 食品科学与工程学院,湖北 武汉 430023)

摘 要: 高温烹调加工肉类食品及烟草燃烧过程中所产生的杂环胺(HAAs)是一类具有致突变、致癌作用的物质。相关流行病学研究显示长期摄入高温烹调的、富含HAAs的肉类食物,提升了前列腺癌、乳腺癌、肠癌的患病风险。但现有研究成果尚不能对HAAs的摄入与相关癌症风险的关系进行有效评估。寻找长效、稳定的生物标记物并建立高选择性、高灵敏度的检测方法是该项研究的关键所在。本综述着重讨论了可能应用于分子流行病学研究中HAAs的生物标记物,包括HAAs、HAA的代谢物、DNA加合物和蛋白质加合物。同时也对用于HAAs生物监控的分析方法进行了讨论。

关键词: 杂环胺;致癌物;生物标记物;代谢物;加合物

中图分类号: TS 201.2

文献标识码: A

Biomarkers of food-borne carcinogen heterocyclic aromatic amines

PENG Li-juan

(School of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: Heterocyclic aromatic amines (HAAs) are carcinogens and mutagens that are formed during the high-temperature cooking of meats. A number of studies have reported a positive association between well-done meat consumption and cancer risks of the human prostate, mammary and colon. However, the association of HAAs formed in cooked meat and cancer risks has been difficult to establish. There is a critical need to establish stable, long-term biomarkers of HAAs, and develop corresponding methods with high selectivity and sensitivity. In this review, we highlight the biomarkers of HAAs that may be implemented in molecular epidemiology studies, including HAAs, their metabolites, DNA adducts and protein adducts. The advanced analytical approaches that have been successfully developed to biomonitor biological effects of these chemicals are also discussed.

Key words: heterocyclic aromatic amine (HAA); carcinogen; biomarker; metabolite; adduct

1 引言

在鱼肉、红肉、禽肉的高温烹饪处理过程中所产生的杂环胺(heterocyclic aromatic amines, HAAs)是

一类之于人类及锯齿类动物具有致突变、致癌变作用的多环芳香族化合物。上世纪七十年代末,科学家 Sugimura 最先在熟鱼肉中发现了致突变物^[1-2]。而迄今为止已有 20 余种 HAAs 在烹制后的肉食里被发现和研究。这些 HAAs 分为两大类(图 1)。第

收稿日期:2016-03-30.

作者简介:彭利娟(1974-),女,博士,副教授, E-mail: lijuan_peng@hotmail.com.

基金项目:国家自然科学基金(21405118).

一类 HAA 是分子结构中含有 *N*-甲基-2-氨基咪唑基团,包括喹啉类(如:2-氨基-3-甲基咪唑并[4,5-*f*]喹啉, IQ), 喹啉类(如:2-氨基-3-甲基咪唑并[4,5-*f*]喹啉, IQ_x) 和 2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑并[4,5-*b*]吡啶(PhIP)等,被认为是氨基酸热降解产物吡啶或吡嗪与糖类及肌酸的反应产物,通常是在 150—250℃ 的加工温度下产生^[3];第二类 HAA 包括 2-氨基-9H-吡啶[2,3-*b*]咪唑(AαC) 和 2-氨基-3-甲基-9H-吡啶[2,3-*b*]咪唑(MeAαC)等,一般在 250℃ 以上的高温下生成,是蛋白质中谷氨酸和色氨酸的热分解产物^[4]。HAA 产生的多寡取决于肉的品种,烹制的时间和温度等。PhIP 和 2-氨基-3,8-二甲基咪唑并[4,5-*f*]喹啉(MeIQ_x)是煎烤红肉时产生最多的两种 HAA^[5-7]。有研究显示每克完全煮熟的猪肉里所含的 PhIP 可以高达 480ng^[6]。基于对国际上 HAA 毒理数据的采集与汇总,国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)已将 IQ 归类为很可疑致癌物(2A 级),而其他几种包括 PhIP 和 MeIQ_x 在内的 HAA

则被定义为潜在类致癌物(2B 级)^[8]。而美国国家毒理学项目(National Toxicology Program)也在第 11 期致癌物报告(Report on Carcinogenesis, ROC)中将常见的 HAA 合理地预测为人类致癌物^[9]。

早期对于肉制品中 HAA 的定性和定量分析是使用多级层析法将 HAA 从公斤级的熟肉中分离提纯出来。每一步的纯化均用 Ames 细菌致突变测试法对突变物进行监控,最后使用 NMR 和质谱对分离出的致突变物进行结构定性^[1]。但是这类研究方法非常耗费人力。1992 年, Gross 使用硅基树脂和混合阳离子交换/疏水树脂发展了多级固相萃取的方法对肉制品中的 HAA 进行提取,提取出的 HAA 经 HPLC 进一步分离后进行 UV 或荧光定量^[10]。这一方法样品用量少、分析速度快、检测灵敏度高。近年来多级固相萃取方法已被广泛运用于各类肉制品中 HAA 的提取。在结合使用液相色谱-多级质谱联用技术(LC-MS/MS)后,实现了对熟肉中超微量的 HAA (pg/g) 进行定量检测^[11]。

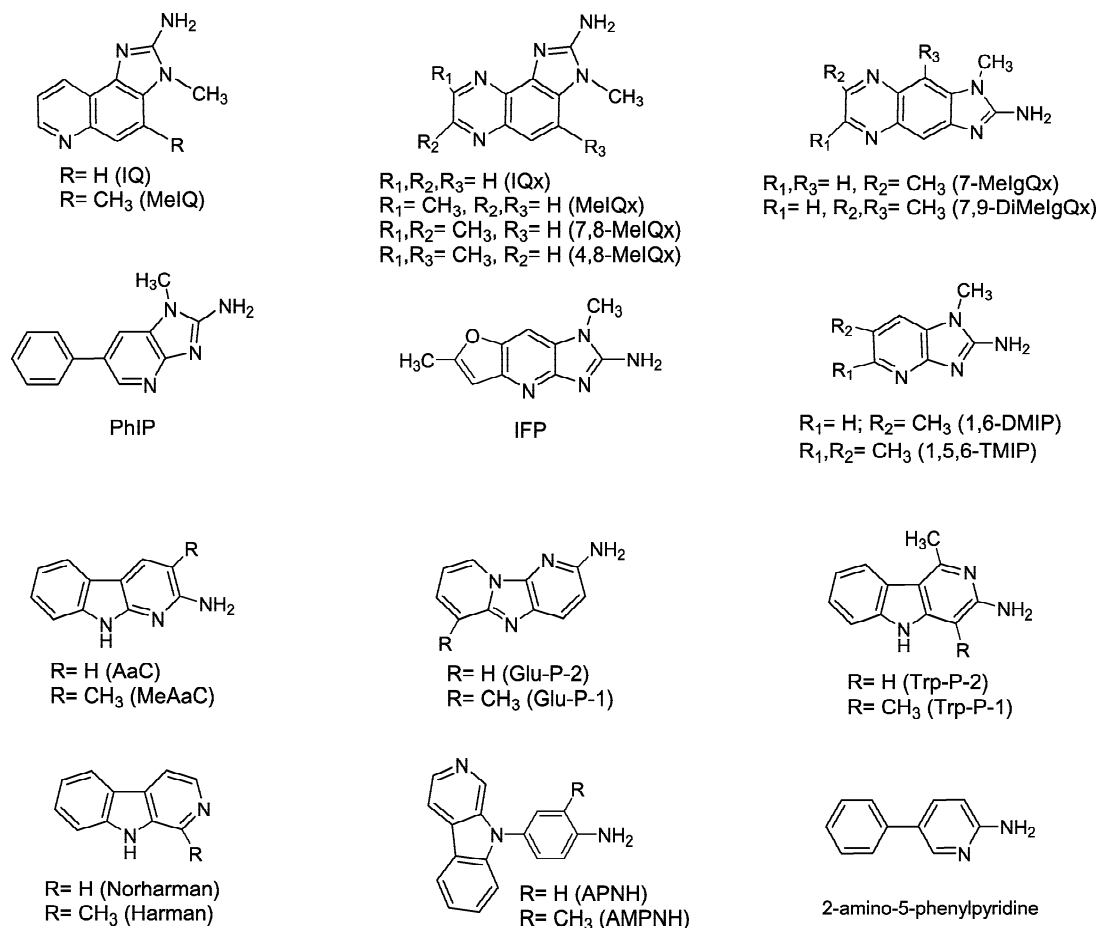


图 1 HAA 的化学结构

目前国际上对 HAA 的研究全面且深入,包括 生物毒理的研究、分离提纯方法的优化、在各种肉食

制品中含量的测定、不同加工方式和条件的影响、生物代谢方式、摄入量与致癌风险的关系等。

2 HAAs 的生物毒性和致癌机理

早期 HAAs 的生物毒性是使用 Ames 细菌致突变测试法进行致突变性测定。Ames 细菌致突变测试法中,鼠伤寒沙门氏杆菌 TA98 菌株用于检测移码突变,而 TA100 菌株是检测碱基对改变突变。Ames 鼠伤寒沙门氏杆菌试验显示 HAAs 更易导致移码突变,不同 HAAs 的致突变能力可相差上千倍。其中 IQ 和 MeIQ 是非常强的致突变物。但使用 Ames 测试法评估 HAAs 的致癌风险并不准确。例如,Ames 测试显示 MeIQx 的致突变能力强过 PhIP 约 100 倍。但它们对于锯齿动物来说都是非常强的致癌物。长期喂食同等剂量的 MeIQx 和 PhIP 均诱发锯齿动物多部位的肿瘤^[1]。

动物实验发现长期摄入 HAAs 可诱发锯齿动物

口腔、肝脏、胃、肺、结直肠、膀胱、前列腺和乳腺等多种靶器官的肿瘤。各种 HAA 诱发肿瘤的总投喂量 (TD_{50}) 差异很大,同种 HAA 对于不同种类动物的 TD_{50} 也有差别。已有报道显示各 HAA 对锯齿动物的 TD_{50} 在 0.1 — 64.6 mg/kg/day^[1]。

在研究 HAAs 对人类的风险时发现,HAAs 会引发姐妹染色单体交换,微核形成和非常规 DNA 合成;同时锯齿动物体内实验及人细胞和锯齿动物细胞体外实验显示有些 HAA 可引发 DNA 的损伤和染色体的畸变^[8,12]。人体内的 HAAs 在酶细胞色素 P450 的作用下 *N*-羟基化,*N*-羟基化的 HAA 代谢物 (HONH-HAA) 再经二期酶 *N*-乙酰转移酶 (*N*-acetyltransferases, NATs) 或硫转移酶 (sulfotransferases, SULTs) 的进一步激活产生 nitrenium 离子与 DNA 反应,诱发变异^[13]。以 PhIP 为例示意如图 2。

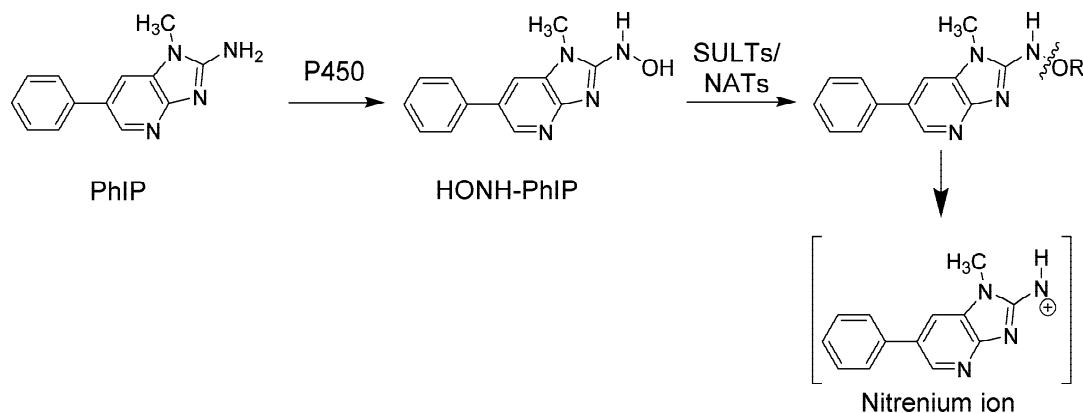


图 2 PhIP 在人体内的主要代谢途径

3 生物标记物

现有流行病学研究的数据尚不足以对癌症和 HAAs 摄取之间的关系进行有效评估。有研究报告证实长期食用煮熟的肉类 (含 HAAs 的肉制品) 提高了患胃癌,结肠癌,胰腺癌,前列腺癌和乳腺癌的风险;但也有研究表明熟肉与癌症风险之间并不存在直接关联^[14-20]。熟肉中产生的 HAAs 与癌症风险之间的联系之所以一直难以确定,一个最大的制约因素在于无法对长期摄入的 HAAs 做定量评估。因而确立稳定的、长期的生物标记物对于研究 HAAs 摄取与癌症风险关系的至关重要。

3.1 HAAs 在尿液中的代谢物

尿液样品通常可获取量较其他生物样本 (如组织,血液,毛发等) 多,其中所携带的致癌物及其代

谢产物可在提取富集后用于对短期内相关致癌物摄入情况的评估。同时通过对致癌物的尿代谢物组成和结构的分析,可进一步了解致癌物在体内的相关生物活化程度。

HAAs 在尿液中主要是以其代谢物的形式存在。因为煎烤烹制的红肉中 PhIP 和 MeIQx 含量最多,所以早期对尿液代谢物的研究主要集中于这两种 HAAs。PhIP 在人尿中的主要代谢物是 PhIP 的 N^2 -和 N^3 -葡萄糖苷酸聚合物 (PhIP- N^2 -Gl, PhIP- N^3 -Gl) 和 HONH-PhIP 的 *N*-葡萄糖苷酸聚合物 (HON-PhIP- N^2 -Gl, HON-PhIP- N^3 -Gl)^[21-22]。MeIQx 的主要尿代谢物是 MeIQx 的氨基磺酸盐 (MeIQx- N^2 -SO₃H)、IQx-8-COOH, MeIQx 的 N^2 -葡萄糖苷酸聚合物 (MeIQx- N^2 -Gl), 和 HONH-MeIQx 的 N^3 -葡萄糖苷酸聚合物 (HON-MeIQx- N^3 -Gl)^[23-24] (图 3)。这些代

谢物主要是在葡糖醛酸基转移酶 (UDP-glucuronosyltransferases, UGTs)、酶细胞色素 P450 和 SULTs 的

作用下产生。

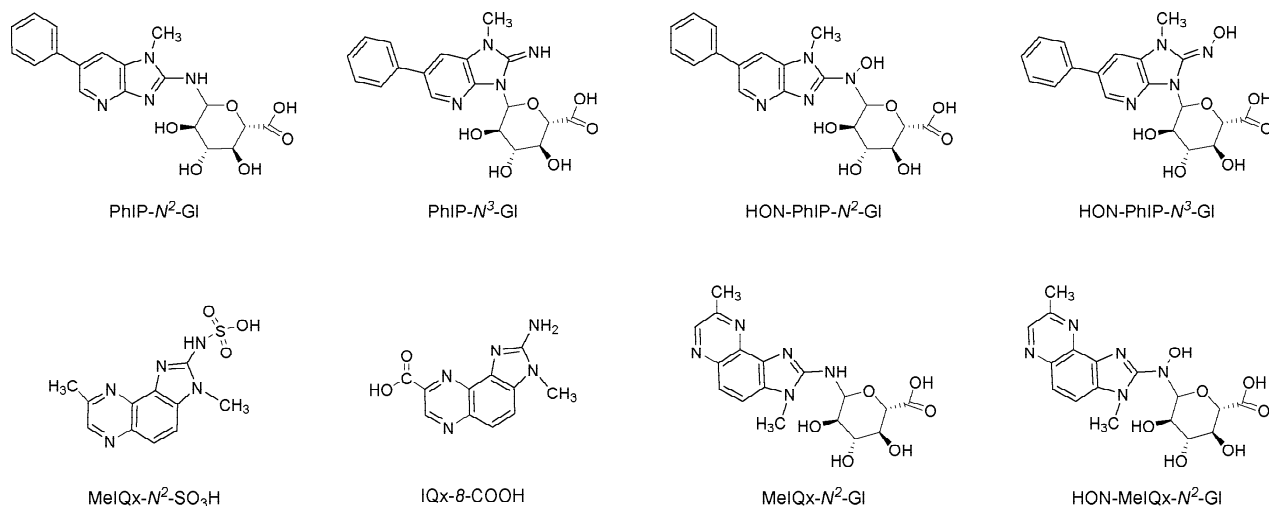


图3 PhIP 和 MeIQx 的主要代谢物

目前从尿液中分离 HAAs 及其代谢物的分析方法包括:溶剂萃取^[25],固相萃取 (SPE)^[26],免疫亲和^[27]等。分离好的相关代谢物配合使用荧光,气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 或 LC-MS/MS 进行定性定量分析。Gu 等人使用 SPE 分离方法与超高效液相色谱-质谱联用技术 (UPLC-MS) 所建立的快速、高灵敏度的分析方法在测量 PhIP 和 MeIQx 的代谢物时,定量限低至 10 — 40 pg/mL^[28]。通常情况下人们摄入的 HAAs 大部分在 24 — 48h 内随尿液排出,所以尿液中所检测到的 HAAs 含量只能反映短期内 HAAs 的摄入情况。对比相关研究,不同个体的尿液中所检测到的 HAAs 含量差异特别大,这很可能是因为人们的吃食中所含 HAAs 的量存在差异^[29-31]。

3.2 毛发中 HAAs

人和动物的毛发中已发现多种药物和污染物累积。人和动物的毛发已用于对尼古丁、麻醉剂和荷尔蒙等化合物的生物监控。动物实验发现 PhIP 在黑色素多的组织里沉积,标记的 PhIP 在摄入后 4 周还可以在毛发中检测到^[25]。在 6 个月间对两个杂食者的头发样本进行定期采集和分析发现,头发中 PhIP 的含量分别是 407 — 545 和 669 — 855 pg/g 期^[32]。不同时间测量的偏差小于 24%,这说明 PhIP 的摄入与其在头发中的累积相对稳定。因而毛发里 HAAs 可用作生物标记物对长期的 HAAs 摄入情况进行评估。

PhIP 是在头发中沉积最多的 HAA,通常含量在 60 — 7 500 pg/g。目前对于这么微量的 HAAs 的检

测主要是选用高灵敏度的质谱手段结合各类萃取技术来进行。Alexander 等人使用 GC-MS 对人发中的 PhIP 进行检测^[25];而 Kobayashi 建立了 LC-MS 方法对人发中的 PhIP 进行定量^[33]。这两种方法都需要上百毫克的头发样品。近期的研究通过同时使用溶剂萃取和固相萃取方法对头发中的 HAAs 进行分离,然后使用 LC-MS/MS 定量。该方法的头发样本用量只需 50 mg,定量限为 50 pg/g^[32]。使用该方法所检测到的 PhIP 含量与前两种方法相近。但是发现所测样本的 AaC 和 MeIQx 均低于定量限。

在检测人发中的 PhIP 时发现色素对 PhIP 有很强的亲和性,色素含量高的头发 (深色头发) 更利于 PhIP 的沉积。所以定量不同颜色头发中的 PhIP 来评估 PhIP 的长期摄入情况时应考虑这一因素。现代社会越来越多的人热衷于染发。使用染发剂进行染发的过程中,头发中累积的 PhIP 很可能发生化学反应变化,导致其含量减少;同时染发剂中大量的化学物质可能进入头发中,这些化合物的存在会对 PhIP 的分离和检测产生极大的干扰,从而影响检测的灵敏度。近期高分辨率的 Orbitrap 质谱技术被用于对染色头发中的 PhIP 分析。该方法采用多级质谱手段消减染色剂化合物对 PhIP 检测的干扰。在对染色头发中的 PhIP 进行测量时,定量限达到 84 pg/g^[34]。

3.3 DNA-HAA 加合物

HAAs 与 DNA 的反应主要是通过 HAAs 的 N -羟基化代谢物 (HONH-HAAs) 酯化后所产生的中间体 nitrenium 离子与脱氧鸟苷 (dG) 上 C-8 原子反应

生成 dG-C8-HAA 加合物。实验室合成 DNA-HAA 加合物是使用乙烯酮或者乙酸酐作为酰化剂与 HONH-HAA 反应生成易形成 nitrenium 离子的活性 *N*-乙酰化-HAA 中间体^[35-37]。*N*-乙酰化-HAA 非常不稳定,目前只有 *N*-乙酰化-PhIP 通过质谱确定了

分子结构^[36]。体内和体外实验现已合成及检测到包括 PhIP^[36], IQ^[37], MeIQ^[38], MeIQx^[39], 2-氨基-3,4,8-三甲基咪唑[4,5-*f*]喹啉(4,8-DiMeIQx)^[40], AαC 和 MeAαC^[41]的 dG-C8 加合物(图4)。

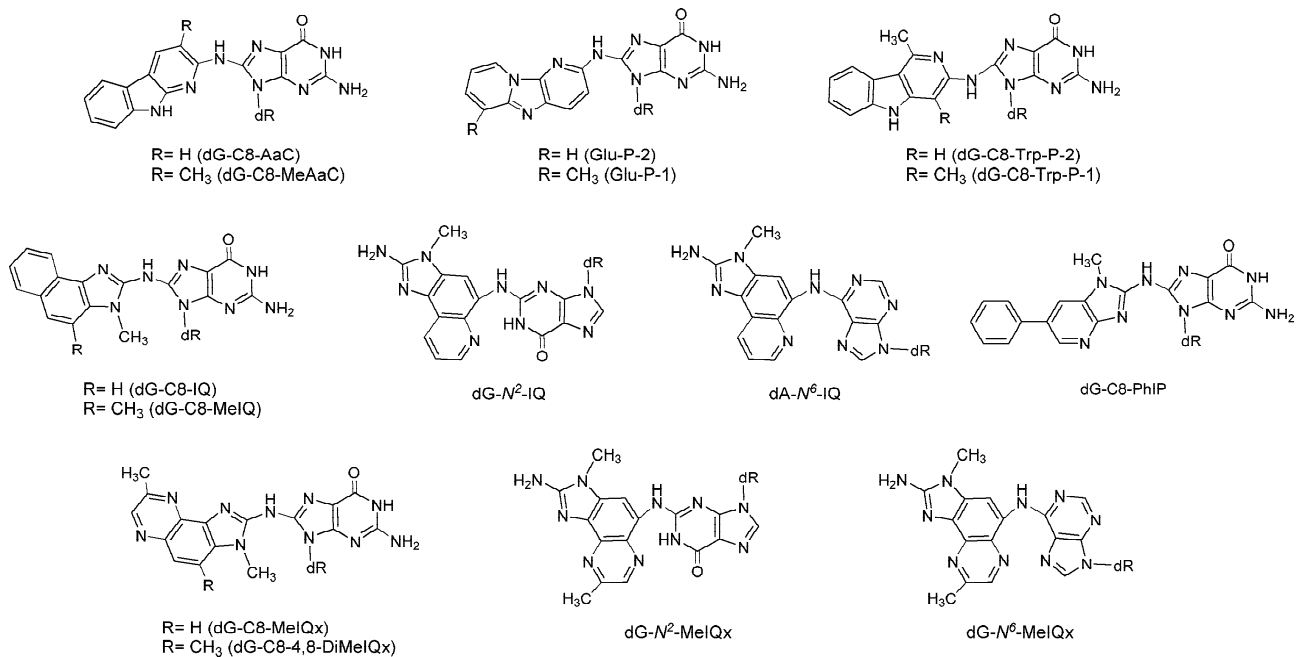


图4 DNA-HAA 加合物的结构

体内和体外实验发现 IQ 与 MeIQx 杂环上的 C-5 原子也会与 dG 上的 N²基团反应形成 dG-N²加合物^[39]。在使用 dG 或脱氧腺苷(dA)与 *N*-乙酰化-IQ 进行反应时生成了 dG-N⁷-IQ 和 dA-N⁶-IQ 加合物^[42]。动物实验中发现老鼠的肝脏里有 dA-N⁶-MeIQx 加合物的存在^[43]。

从理论上来说,选择标靶组织中 DNA 加合物作为生物标记物去评估 HAAs 的致癌风险最为直接、合理。目前研究所用到的人体组织样本经常是临床诊断过程中从患者体内所切除的病变组织。在进行检测分析时,一般假定病变组织中加合物的含量可反映癌变形成初期组织里加合物的含量。对于人体组织样本中 DNA-HAA 加合物含量的测定,目前主要运用的技术手段包括³²P-postlabeling, 免疫组织化学技术(IHC)和质谱技术。

³²P-postlabeling 技术在检测 DNA-HAA 加合物方面非常灵敏。Totsuka 等人使用该方法在人的直肠、结肠和肾脏中分别检测到含量为 14, 18 和 1.8 个 dG-C8-MeIQx 加合物/10¹⁰核苷酸^[44]。大部分乳腺癌产生于导管上皮细胞。Gorlewska-Roberts 等人使用³²P-postlabeling 技术方法对剥落在人乳里面的

导管上皮细胞中的 DNA 加合物进行了分析,64 个来自于健康、不吸烟母亲的样本中有 31 个样本里检测到了 DNA-PhIP 加合物,平均含量在 4.7 个加合物/10⁷核苷酸^[45]。数据证实人们对熟肉的消耗量和 NAT2 都对 DNA-PhIP 的形成有潜在的影响。

人的乳腺组织中也发现了 DNA-PhIP 加合物。这一研究应用了 IHC 手段对乳腺癌患者和非乳腺癌患者的正常乳腺组织进行了分析检测,分别在 82% 的乳腺癌患者和 71% 非乳腺癌患者的组织样本中发现了 DNA-PhIP 加合物,含量高于 1 个加合物/10⁷碱基^[46]。

GC-MS 方法检测 DNA-HAA 加合物是通过对在碱性环境下不稳定的 dG-C8-HAA 加合物水解后产生的 HAAs 进行定量。使用该方法对肠粘膜样本和肠癌患者的淋巴细胞样本进行分析发现每 10⁸ 个 DNA 碱基中的加合物在几个范围以内。其中 30% 的淋巴细胞样本中检测到 dG-C8-PhIP 加合物。比较吸烟者、食肉多的人、和食肉少的人的淋巴样本,并未发现前二者加合物的含量明显高过后者^[47]。由于该项研究没有个体的实际 PhIP 摄入量信息,因而无法确定 DNA-PhIP 加合物形成与 PhIP 摄入之

间的关系。

上述的几种检测方法都不能准确提供 DNA 加合物的结构信息。近年来高选择性,高灵敏度液相色谱质谱联用技术(LC-MS)发展迅猛,可以对人组织样本中的 DNA 加合物进行准确结构定性和含量分析。Gu 等人使用该方法对乳腺癌患者的乳腺组织中的 DNA-PhIP 加合物进行了分析,数据显示 70 个组织样本中,只有一个样本检测到了 dG-C8-PhIP 加合物,其含量为 3 个加合物/ 10^9 核苷酸^[48]。这一含量远低于³²P-postlabeling 和 IHC 方法检测到的含量(差两个数量级)。这表明非选择性的³²P-postlabeling 和 IHC 方法可能检测到了除 dG-C8-PhIP 加合物以外的 DNA 损伤。因此,对 dG-C8-HAA 或其他已知结构的加合物应选用 LC-MS 进行有选择性的定量分析。

3.4 蛋白质-HAA 加合物

由于检测人体组织中的 DNA 加合物需要大批量的活检标本通常难以获得;同时 DNA 加合物在形成后经常会被修复,因此人体组织中 DNA 加合物的含量可能极低,即使运用现今高灵敏度的检测手段也可能难以进行有效的定量分析。近年来已有研究采用血红蛋白(Hb)及血清白蛋白(SA)与致癌物形成的加合物取代 DNA 加合物作为生物标记物对几类致癌物质进行生物监控^[49-52]。相较于 DNA 加合物,蛋白质加合物作为生物标记物的优势在于:(1)血液中能提取的蛋白质量远大于 DNA 的量。10 mL 人血中可提取 DNA 的量只有 100 μ g 左右,而 Hb 或 SA 的提取量高达几百毫克。相应地,能获取到的蛋白质加合物也就更多。(2)蛋白质加合物不会被修复。在蛋白质加合物稳定的情况下,长期摄入致癌物所形成的蛋白质加合物将在蛋白质的生命周期内进行积累。人 Hb 的生命周期为 120 天,如果长期摄入致癌物,人体内蛋白质加合物含量将是单次摄入的 60 倍。这将大大提高加合物检测的灵敏度^[49]。但在选用蛋白质加合物作为生物标记物研究癌症风险时,需要考虑蛋白质加合物并不表征基因损伤情况,也不是产生于靶位置。

在过去的三十年中,Hb 和 SA 与多类不同的人体致癌物所形成的加合物已替代 DNA 加合物,被用作人体生物标记物对相关致癌物进行生物监控。多种芳香胺在人和实验室动物体内与 Hb 形成了 Hb-

芳香胺加合物。通过对吸烟和不吸烟人群体内 Hb-芳香胺加合物进行检测,发现这种生物标记物与膀胱癌有很强的关联性^[53-54]。HAAs 与 Hb 加合物的形成是通过其 *N*-氧化代谢物先与氧合血红蛋白(HbO₂)反应生成 *N*-亚硝化代谢物和高铁血红蛋白(met-Hb),然后该 *N*-亚硝化代谢物与 Hb 的 β 链上第 93 位的半胱氨酸(Cys⁹³)反应形成加合物。近期有体外实验研究显示 A α C 的 *N*-羟基化代谢物(HONH-A α C)可引发高铁血红蛋白症,并产生 Hb-A α C 加合物。但 PhIP 和 MeIOx 的 *N*-羟基化代谢物 HONH-PhIP 和 HONH-MeIOx 并没有与 HbO₂ 反应产生加合物^[55]。Glu-P-1 的 *N*-羟基化代谢物和 *N*-亚硝化代谢物也证实与 Hb 上的巯基反应^[56]。而动物实验显示包括 IQ、MeIQx 和 PhIP 在内的几种 HAAs 在摄入后,只有很少的一部分(约摄入量的 0.01%)与动物体内的 Hb 反应产生蛋白质加合物^[57-59]。这些 Hb-HAA 加合物在人体内含量过低,无法进行定量检测^[60]。因而选用人体的 Hb-HAA 加合物作为致癌物 HAAs 的生物标记物可能并不理想。

SA 具有结合和运输内源性、外源性物质,维持血液胶体渗透压,清除自由基,抑制血小板聚集和抗凝血等生理功能,在生命过程中有极其重要的意义。SA 的肽链包含 585 个氨基酸,是血浆中含量最高的蛋白质,约占血浆总蛋白的 60%。研究显示 SA 与氰化物、氮芥、神经毒素双鞭甲藻毒素 B 等多种有毒、致癌试剂与 SA 反应生成蛋白质加合物^[61-63]。SA 的 Cys³⁴ 上拥有整个蛋白质肽链上唯一的自由巯基(-SH)。大量研究证实这一自由巯基对各种毒性化合物的代谢产物具有反应活性。包括 IQ、MeIOx 和 PhIP 在内的几种 HAAs 与锯齿类动物的 SA 或人血清白蛋白(HSA)上的 Cys³⁴ 发生反应形成 SA-HAA 加合物^[60, 64-65]。这类 SA-HAA 加合物在酸性环境下不稳定,易水解释放 HAAs。近期的体外实验证实了这些加合物是 HAA 的代谢物通过亚磺酰胺形式链接于 SA 的 Cys³⁴ 上而形成^[66]。SA-HAA 加合物在体内形成的过程以 PhIP 为例:首先 PhIP 的 *N*-氧化代谢物 HONH-PhIP 在细胞色素 P450 酶或过渡金属的作用下氧化生成 *N*-亚硝化代谢物(NO-PhIP),NO-PhIP 能与 SA 上的 Cys³⁴ 结合形成蛋白质加合物(图 5)。

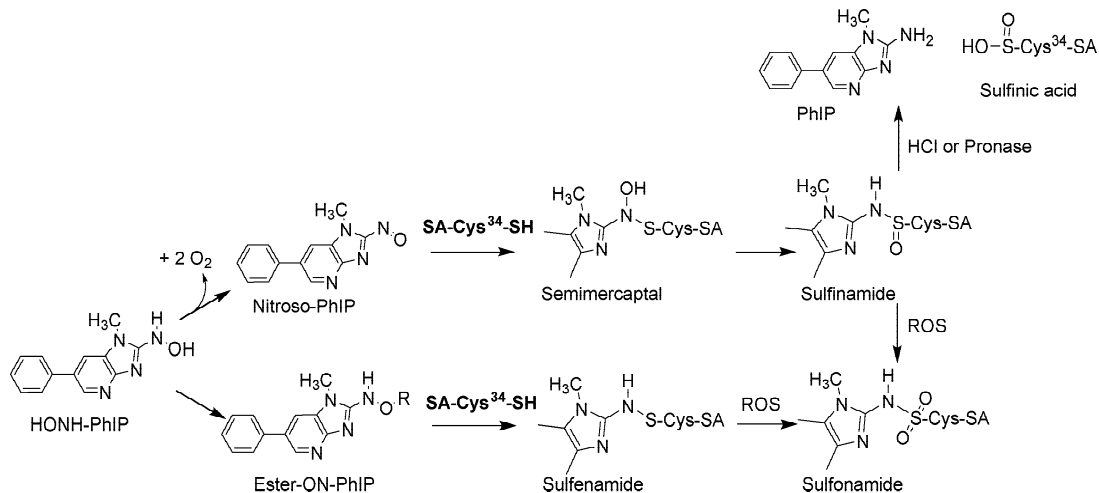


图5 PhIP 代谢物与 SA 反应形成的 SA-PhIP 加合物 (ROS:活性氧化物)

加速器质谱 (Accelerated Mass Spectrometry, AMS) 检测方法发现人血中 HSA-PhIP 加合物的含量远高于 HSA-MeIQx 加合物。人血中每毫克 HSA 所含的 HSA-PhIP 加合物量在飞摩尔级 (fmol), 食肉人群血液中的加合物的含量是素食人群的 10 倍^[60]。UPLC-MS 检测方法对 HSA-PhIP 加合物的检测定量限可达 300 fmol/mg HSA^[67]。但对于临床血样的检测, 这一方法还需要进一步优化。

5 小结

近年来高分辨率、高灵敏度 LC-MS 技术的迅速发展, 实现了对人体内 HAAs 的代谢产物、DNA 加合物和蛋白质加合物的定性和定量分析。通过检测尿液中 HAAs 代谢物可了解 HAAs 在人体内的活化程度和短期内个体对 HAAs 的摄入情况。头发中沉积的 HAAs 可提供个体在长时间内对 HAAs 的摄入情况。相关实验显示 HAAs 与血浆中的 SA 及白细胞中的 DNA 所形成的加合物可用做生物标记物研究 HAAs 的摄入与相关癌症风险之间的关系。在流行病学研究中, 对这些 HAAs 的生物标记物进行监控, 有助于对 HAAs 的致癌风险进行合理评估。

参考文献:

- [1] Sugimura T, Wakabayashi K, Nakagama H, et al. Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish [J]. Cancer Sci, 2004, 95: 290-299.
- [2] Turesky R J. The role of genetic polymorphisms in metabolism of carcinogenic heterocyclic aromatic amines [J]. Current drug metabolism, 2004, 5: 169-180.
- [3] Skog K I, Johansson M A, Jagerstad M I. Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake [J]. Food Chem Toxicol, 1998, 36: 879 - 896.
- [4] Matsumoto T, Yoshida D, Tomita H. Determination of mutagens, amino-alphacarbolines in grilled foods and cigarette smoke condensate [J]. Cancer Lett, 1981, 12: 105-110.
- [5] Guy P A, Gremaud E, Richoz J, et al. Quantitative analysis of mutagenic heterocyclic aromatic amines in cooked meat using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2000, 883: 89-102.
- [6] Felton J S, Jagerstad M, Knize M G, et al. Food Borne Carcinogens Heterocyclic Amines [M]. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd., 2000: 31-71.
- [7] Turesky R J, Taylor J, Schnackenberg L, et al. Quantitation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines and detection of novel heterocyclic aromatic amines in cooked meats and grill scrapings by HPLC/ESI-MS [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53: 3248-3258.
- [8] International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans [R]. Lyon, France: IARC, 1993: 165-242.
- [9] National Toxicology Program. Report on Carci-

- nogenesis (Eleventh Edition) [R]. Research Triangle Park, N. C. : U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2005.
- [10] Gross G A, Gruter A. Quantitation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic aromatic amines in food products [J]. J Chromatogr, 1992, 592: 271 - 278.
- [11] Ni W, McNaughton L, LeMaster D M, et al. Quantitation of 13 heterocyclic aromatic amines in cooked beef, pork, and chicken by liquid chromatography-electrospray ionization/tandem mass spectrometry [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(1): 68-78.
- [12] National Toxicology Program. Report on Carcinogenesis Background Document for Heterocyclic Amines: PhIP, MeIQ and MeIQx [R]. Research Triangle Park, N. C. : U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2002.
- [13] Turesky R J, Le Marchand L. Metabolism and biomarkers of heterocyclic aromatic amines in molecular epidemiology studies: lessons learned from aromatic amines [J]. Chem Res Toxicol, 2011, 24: 1169-1214.
- [14] Augustsson K, Skog K, Jagerstad M, et al. Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder, and kidney: a population-based study [J]. Lancet, 1999, 353 (9154): 703-707.
- [15] Alaejos M S, Gonzalez V, Afonso A M. Exposure to heterocyclic aromatic amines from the consumption of cooked red meat and its effect on human cancer risk: a review [J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2008, 25: 2-24.
- [16] De Stefani E, Ronco A, Mendilaharsu M, et al. Meat intake, heterocyclic amines, and risk of breast cancer: a case-control study in Uruguay [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1997, 6(8), 573-581.
- [17] Delfino R J, Sinha R, Smith C, et al. Breast cancer, heterocyclic aromatic amines from meat and N-acetyltransferase 2 genotype [J]. Carcinogenesis, 2000, 21(4): 607-615.
- [18] Sinha R. An epidemiologic approach to studying heterocyclic amines [J]. Mutat Res, 2002, 506-507: 197-204.
- [19] Knize M G, Felton J S. Formation and human risk of carcinogenic heterocyclic amines formed from natural precursors in meat [J]. Nutr Rev, 2005, 63(5): 158-165.
- [20] Zheng W, Lee S A. (2009) Well-done meat intake, heterocyclic amine exposure, and cancer risk [J]. Nutr Cancer, 2005, 61: 437-446.
- [21] Kulp K S, Knize M G, Fowler N D, et al. PhIP metabolites in human urine after consumption of wellcooked chicken [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004, 802: 143 - 153.
- [22] Walters D G, Young P J, Agus C, et al. Cruciferous vegetable consumption alters the metabolism of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP) in humans [J]. Carcinogenesis, 2004, 25: 1659 - 1669.
- [23] Turesky R J, Garner R C, Welti D H, et al. Metabolism of the food-borne mutagen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in humans [J]. Chem Res Toxicol, 1998, 11: 217 - 225.
- [24] Turesky R J, Guengerich F P, Guillouzo A, et al. Metabolism of heterocyclic aromatic amines by human hepatocytes and cytochrome P4501A2 [J]. Mutat Res, 2002, 506 - 507: 187 - 195.
- [25] Alexander J, Reistad R, Hegstad S, et al. Biomarkers of exposure to heterocyclic amines: approaches to improve the exposure assessment [J]. Food Chem Toxicol, 2002, 40: 1131 - 1137.
- [26] Holland R D, Taylor J, Schoenbachler L, et al. Rapid biomonitoring of heterocyclic aromatic amines in human urine by tandem solvent solid phase extraction liquid chromatography

- electrospray ionization mass spectrometry [J]. Chem Res Toxicol, 2004, 17:1121 - 1136.
- [27] Stillwell W G, Kidd L C, Wishnok J S, et al. Urinary excretion of unmetabolized and phase II conjugates of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in humans: Relationship to cytochrome P450 1A2 and N-acetyltransferase activity [J]. Cancer Res, 1997, 57: 3457 - 3464.
- [28] Gu D, Raymundo M M, Kadlubar F F, et al. Ultrapformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for biomonitoring cooked meat carcinogens and their metabolites in human urine [J]. Anal Chem, 2011, 83(3):1093-101.
- [29] Ushiyama H, Wakabayashi K, Hirose M, et al. Presence of carcinogenic heterocyclic amines in urine of healthy volunteers eating normal diet, but not of inpatients receiving parenteral alimentation [J]. Carcinogenesis, 1991, 12: 1417 - 1422.
- [30] Ji H, Yu M C, Stillwell W G, et al. Urinary excretion of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in white, black, and Asian men in Los Angeles County [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1994, 3: 407 - 411.
- [31] Kidd L C, Stillwell W G, Yu M C, et al. Urinary excretion of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in White, African-American, and Asian-American men in Los Angeles County [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1999, 8: 439 - 445.
- [32] Bessette E E, Yasa I, Dunbar D, et al. Biomonitoring of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in hair: a validation study [J]. Chem Res Toxicol, 2009, 22(8):1454-63.
- [33] Kobayashi M, Hanaoka T, Hashimoto H, et al. 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) level in human hair as biomarkers for dietary grilled/stir-fried meat and fish intake [J]. Mutat Res, 2005, 588:136 - 142.
- [34] Guo J, Yonemori K, Le Marchand L, et al. Method to Biomonitor the Cooked Meat Carcinogen 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in Dyed Hair by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Orbitrap High Resolution Multistage Mass Spectrometry [J]. Anal Chem, 2015, 87(12):5872-5877.
- [35] Turesky R J, Lang N P, Butler M A, et al. Metabolic activation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by human liver and colon [J]. Carcinogenesis, 1991, 12:1839 - 1845.
- [36] Frandsen H, Grivas S, Andersson R, et al. Reaction of the N2-acetoxy derivative of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) with 20-deoxyguanosine and DNA. Synthesis and identification of N2-(20-deoxyguanosin-8-yl)-PhIP [J]. Carcinogenesis, 1992, 13: 629 - 635.
- [37] Snyderwine E G, Roller P P, Adamson R H, et al. Reaction of the N-hydroxylamine and N-acetoxy derivatives of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline with DNA. Synthesis and identification of N-(deoxyguanosin-8-yl)-IQ [J]. Carcinogenesis, 1988, 9:1061 - 1065.
- [38] Tada A, Ochiai M, Wakabayashi K, et al. Identification of N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline (dG-C8-MeIQ) as a major adduct formed by MeIQ with nucleotides in vitro with DNA in vivo [J]. Carcinogenesis, 1994, 15:1275 - 1278.
- [39] Turesky R J, Rossi S C, Welti D H, et al. Characterization of DNA adducts formed in vitro by reaction of N-hydroxy-2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline and N-hydroxy-2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline at the C-8 and N² atoms of guanine [J]. Chem Res Toxicol, 1992, 5: 479 - 490.
- [40] Frandsen H, Grivas S, Turesky R J, et al. Formation of DNA adducts by the food mutagen 2-amino-3,4,8-trimethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoxaline in vitro and in vivo. Identification of a N²-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-4,8-DiMeIQx adduct [J]. Carcinogenesis, 1994, 15: 2553 -

- 2558.
- [41] Frederiksen H, Frandsen H, Pfau W. Syntheses of DNA-adducts of two heterocyclic amines, 2-amino-3-methyl-9Hpyrido[2,3-b]indole (MeA α C) and 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole-(A α C) and identification of DNA-adducts in organs from rats dosed with MeA α C [J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25: 1525 - 1533.
- [42] Jamin E L, Arquier D, Canlet C, et al. New insights in the formation of deoxynucleoside adducts with the heterocyclic aromatic amines PhIP and IQ by means of ion trap MSn and accurate mass measurement of fragment ions[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2007, 18: 2107 - 2118.
- [43] Bessette E E, Goodenough A K, Langouet S, et al. Screening for DNA adducts by data-dependent constant neutral loss-triple stage mass spectrometry with a linear quadrupole ion trap mass spectrometer[J]. *Anal Chem*, 2009, 81: 809 - 819.
- [44] Totsuka Y, Fukutome K, Takahashi M, et al. Presence of N²-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (dG-C8-MeIQx) in human tissues[J]. *Carcinogenesis*, 1996, 17: 1029 - 1034.
- [45] Gorlewska Roberts K, Green B, Fares M, et al. Carcinogen-DNA adducts in human breast epithelial cells[J]. *Environ Mol Mutagen*, 2002, 39: 184 - 192.
- [46] Zhu J, Chang P, Bondy M L, et al. Detection of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-DNA adducts in normal breast tissues and risk of breast cancer[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003, 12: 830 - 837.
- [47] Friesen M D, Kaderlik K, Lin D, et al. Analysis of DNA adducts of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in rat and human tissues by alkaline hydrolysis and gas chromatography/electroncapture mass spectrometry: validation by comparison with ³²Ppostlabeling[J]. *Chem Res Toxicol*, 1994, 7: 733 - 739.
- [48] Gu D, Turesky R J, Tao Y, et al. DNA adducts of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 4-aminobiphenyl are infrequently detected in human mammary tissue by liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33 (1): 124-130.
- [49] Skipper P L, Tannenbaum S R. Protein adducts in the molecular dosimetry of chemical carcinogens[J]. *Carcinogenesis*, 1990, 11: 507-518.
- [50] Skipper P L, Peng X, SooHoo C K, et al. Protein adducts as biomarkers of human carcinogen exposure[J]. *Drug Metab Rev*, 1994, 26: 111-124.
- [51] Liebler D C. Proteomic approaches to characterize protein modifications: new tools to study the effects of environmental exposures[J]. *Environ Health Perspect*, 2002, 110 (Suppl 1): 3-9.
- [52] Tornqvist M, Fred C, Haglund J, et al. Protein adducts: quantitative and qualitative aspects of their formation, analysis and applications[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002, 778: 279-308.
- [53] Skipper P L, Tannenbaum S R, Ross R K, et al. Nonsmoking-related arylamine exposure and bladder cancer risk[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003, 12: 503-507.
- [54] Gan J, Skipper P L, Gago Dominguez M, et al. Alkylaniline-hemoglobin adducts and risk of non-smoking-related bladder cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96: 1425-1431.
- [55] Pathak K V, Chiu T L, Amin E A, et al. Methemoglobin Formation and Characterization of Hemoglobin Adducts of Carcinogenic Aromatic Amines and Heterocyclic Aromatic Amines [J]. *Chem Res Toxicol*, 2016, 29 (3): 255-69.
- [56] Umemoto A, Monden Y, Tsuda M, et al. Oxidation of the 2-hydroxyamino derivative of 2-amino-6-methyl-dipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole (Glu-P-1) to its 2-nitroso form, an ultimate form reacting with hemoglobin thiol

- groups [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, 151: 1326 - 1331.
- [57] Turesky R J, Skipper P L, Tannenbaum S R. Binding of 2-amino-3-methylimidazo [4, 5-f] quinoline to hemoglobin and albumin in vivo in the rat. Identification of an adduct suitable for dosimetry [J]. *Carcinogenesis*, 1987, 8: 1537-1542.
- [58] Lynch A M, Murray S, Boobis A R, et al. The measurement of MeIQx adducts with mouse haemoglobin in vitro and in vivo: implications for human dosimetry [J]. *Carcinogenesis*, 1991, 12:1067-1072.
- [59] Dingley K H, Freeman S P, Nelson D O, et al. Covalent binding of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline to albumin and hemoglobin at environmentally relevant doses. Comparison of human subjects and F344 rats [J]. *Drug Metab Dispos*, 1998, 26:825-828.
- [60] Dingley K H, Curtis K D, Nowell S, et al. DNA and protein adduct formation in the colon and blood of humans after exposure to a dietary-relevant dose of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1999, 8: 507-512.
- [61] Fasco M J, Iii C R, Stack R F, et al. Cyanide adducts with human plasma proteins: albumin as a potential exposure surrogate [J]. *Chem Res Toxicol*, 2007, 20: 677-684.
- [62] Noort D, Hulst A G., Jansen R. Covalent binding of nitrogen mustards to the cysteine-34 residue in human serum albumin [J]. *Arch Toxicol*, 2002, 76: 83-88.
- [63] Wang Z, Ramsdell J S. Analysis of interactions of brevetoxin-B and human serum albumin by liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *Chem Res Toxicol*, 2011, 24:54-64.
- [64] Green L C, Skipper P L, Turesky R J, et al. In vivo dosimetry of 4-aminobiphenyl in rats via a cysteine adduct in hemoglobin [J]. *Cancer Res*, 1984, 44: 4254-4259.
- [65] Lynch A M, Murray S, Zhao K et al. Molecular dosimetry of the food-borne carcinogen MeIQx using adducts of serum albumin [J]. *Carcinogenesis*, 1993, 14:191-194.
- [66] Peng L, Turesky R J. Mass spectrometric characterization of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine N-oxidized metabolites bound at Cys³⁴ of human serum albumin [J]. *Chem Res Toxicol*, 2011, 24(11):2004-2017.
- [67] Peng L, Turesky R J. Optimizing proteolytic digestion conditions for the analysis of serum albumin adducts of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, a potential human carcinogen formed in cooked meat [J]. *J Proteomics*, 2014, 103:267-78.